

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 5 月 31 日 (31.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/38482 A1

(51) 国際特許分類: **C12M 1/00**, 1/42, G01N
33/53, 33/566, 33/532, 21/76, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08049

(22) 国際出願日: 2000 年 11 月 15 日 (15.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11-334120
1999 年 11 月 25 日 (25.11.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社 (HITACHI SOFTWARE ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒231-8475 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 81 番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中俊明

(TANAKA, Toshiaki) [JP/JP]. 山本顕次 (YAMAMOTO, Kenji) [JP/JP]. 畑野浩一朗 (HATANO, Koichiro) [JP/JP]. 水野克也 (MIZUNO, Katsuya) [JP/JP]; 〒231-8475 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 81 番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

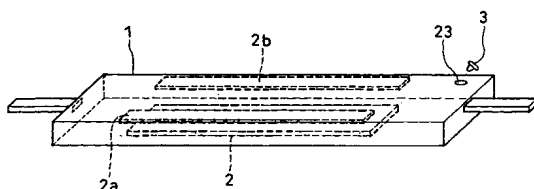
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HYBRIDIZATION DEVICE, CASE, SUPPORT, AND LABEL AGENT

(54) 発明の名称: ハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬



stance can be used for detection.

(57) Abstract: A hybridization device such that the efficiency of the hybridization reaction is high, the reaction time is short, and the detection sensitivity is high, a case, a support, and a label agent are disclosed. A case (1) comprises a metallic support (2) made of a platinized titanium on which a probe DNA is fixed, counter electrodes (2a, 2b) for applying a voltage between the electrodes and the metallic support (2), a cap (3), and a filling port (23). Therefore the hybridization reaction is effected efficiently in a short time. An electrochemiluminescent sub-

[続葉有]

WO 01/38482 A1



(57) 要約:

ハイブリダイゼーション反応の効率を高め、反応時間を短縮することができ、さらに、検出感度を高めることができるハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬である。

ケース（１）は、白金被膜チタンから成りその上にプローブDNAを固定化した金属支持体（２）と、金属支持体（２）との間に電圧を印加するための対向電極（２a）及び対向電極（２b）と、キャップ（３）と、注入口（２３）とで構成されている。

これによりハイブリダイゼーション反応を短時間で効率的に行うことができる。また検出に電気化学発光物質を使うことができる。

明 細 書

ハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬

5 技術分野

本発明は、ハイブリダイゼーション装置、該装置内でハイブリダイゼーション反応を行うためのケース、該ケース内でハイブリダイゼーション反応を行うための支持体、及び、ハイブリダイゼーションのために生体物質に標識する標識試薬に関する。

10

背景技術

従来のハイブリダイゼーション反応は、絶縁体であるガラスプレートから成る支持体上にプローブを固定し、その上から蛍光標識したサンプルを含むハイブリダイゼーション反応溶液を滴下しカバーガラスをのせ、
15 一定時間恒温槽に放置する方法で行っていた。その後、恒温槽から支持体を取り出して洗浄液で支持体を洗浄し、検出器によって標識に用いた蛍光物質を励起させその蛍光を読み取ることで、プローブとハイブリダイズを形成するサンプルを同定することができる。なお、上記プローブ及びサンプルはいずれも生体物質であり、具体的にはDNA又はRNA
20 である。DNAとRNAとのハイブリダイゼーションの場合もある。また、支持体上にサンプルを固定し、ハイブリダイゼーション反応溶液中の蛍光標識したプローブとハイブリダイゼーション反応をさせる場合もある。ここでは支持体上に固定したDNAプローブと、標識したDNAサンプルとをハイブリダイゼーション反応させる場合を例にして説明するが、本発明はこれに限られない。
25

上述した従来の方法でハイブリダイゼーション反応を行うと、反応時間が6～7時間にわたる等、長時間を要していた。このため、高価な多数のハイブリダイゼーション装置を並べて置いて、多数のハイブリダイゼーション反応を同時併行して行うのが普通であり、そのための広い設置スペースを確保しなければならなかった。

本発明の目的は、ハイブリダイゼーション反応の効率を高め、反応時間を短縮することができ、さらに、検出感度を高めることができるハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬を提供することにある。

10

発明の開示

本発明の支持体は、ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する金属を有するものである。これにより、反応溶液に電荷を供給することができ、ハイブリダイゼーション反応溶液中の生体物質を支持体側に引き寄せることができる。また、電気化学発光物質を標識試薬として用いることができる。

15

また、該支持体に生体物質が固定されていることで、例えば特定の病気の診断等に直接用いることができる。

20

さらに、本発明のケースは、ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する電極を有するものである。

また、該ケースは、上記支持体を収容していることで、上記同様にそのケースを特定の病気の診断等に直接用いることができる。

25

また、本発明のハイブリダイゼーション装置は、ハイブリダイゼーション反应用のケースに、反応溶液に電荷を供給する電気を供給するものである。

また、本発明の標識試薬は、生体物質に標識する電気化学発光物質を

有するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の一実施の形態によるハイブリダイゼーション反応に
5 用いるケースの構成を示す斜視図である。

図 2 は、本発明の一実施の形態によるハイブリダイゼーション装置の
構成を示す図である。

図 3 は、本発明の一実施の形態におけるハイブリダイゼーション反応
を説明する図である。

10 図 4 は、本発明の一実施の形態におけるルテニウム錯体を導入したサ
ンプル DNA の構造を説明する図である。

図 5 は、本発明の一実施の形態における電気化学発光を説明する図で
ある。

図 6 は、金属支持体上でのルテニウム錯体と T P A の反応を説明する
15 図である（その 1）。

図 7 は、金属支持体上でのルテニウム錯体と T P A の反応を説明する
図である（その 2）。

発明を実施するための最良の形態

20 以下、添付図面を参照しながら本発明の好適な実施の形態について詳
細に説明する。

図 1 は、本発明の一実施の形態によるハイブリダイゼーション反応に
用いるケースの構成を示す斜視図である。

ケース 1 は金属支持体 2 と対向電極 2 a と対向電極 2 b とキャップ 3
25 と注入口 2 3 で構成されている。

ケース 1 は、反応結果を光学的に検出できるようにするために透明で

あって、かつ耐薬品性が求められるのでアクリル樹脂で構成するのが好適である。その内側下部中央に金属支持体 2 を固設し、金属支持体 2 の両側上部の位置に対向電極 2 a 及び対向電極 2 b を固設し、上から観察する際に対向電極 2 a 及び対向電極 2 b が妨げにならないようにする。

- 5 金属支持体 2 は例えば $25 \times 75 \times 2 \text{ mm}^3$ とし、その上にプローブ DNA を固定化する。このため金属支持体 2 には表面の均一性が求められ、更に電極としての安定性が求められるので、本実施の形態では白金被膜チタンを用いた。

- 10 この場合対向電極 2 a 及び対向電極 2 b は、透明でないので、冷却型 CCD での検出の邪魔にならない位置に付けなければならない。対向電極 2 a 及び対向電極 2 b を透明の電極で形成するのであれば、金属支持体 2 の上の位置に金属支持体 2 と同じ大きさの電極を 1 つ固設するようにしてもよい。

- 15 図 2 は、本発明の実施の形態によるハイブリダイゼーション装置の構成を示す図である。ケース 1 の中に金属支持体 2 を載置し、ハイブリダイゼーション反応溶液を注入してキャップ 3 でふたをしてケース 1 を密閉する。そのケース 1 を加熱するためにペルチェ 4 の上に乗せる。ペルチェ 4 もコンピュータ 13 につながっており、反応温度も調節可能にする。さらに、電源スイッチ 5 によって、金属支持体 2 をプラス側にして
- 20 金属支持体 2 と対向電極 2 a 及び 2 b との間に電圧を印加することにより反応溶液に電界を印加しておいてハイブリダイゼーション反応をさせる。電源スイッチ 5 はコンピュータ 13 につながっていて、コンピュータ 13 で制御できる。このハイブリダイゼーション反応のために印加する電圧は約 100 V 程度である。反応終了後は、ポンプ 14 によりケース 1 内のハイブリダイゼーション反応溶液を排出チューブ 6 を経て、排
- 25 液だめ 8 に排出する。この際、未反応のサンプル DNA 16 (図 3 参照)

はハイブリダイゼーション反応溶液と一緒に排出される。その後、洗浄溶液だめ 9 より注入チューブ 7 を経て洗浄溶液をケース 1 内に注入し、同様に排液だめ 8 に排出する。本実施の形態では洗浄溶液として、0.2XSSC/0.1%SDS 溶液を用いた。さらに、T P A 溶液だめ 1 0 より後述する電気化学発光に必要な T P A (Tripropylamine) 溶液をケース 1 内に注入する。この際、注入する溶液の選択は切替スイッチ 1 5 によって行う。T P A 溶液注入後、再度、電源スイッチ 5 を O N にし、金属支持体 2 に電圧を印加して電気化学発光させる。この電気化学発光のために流す電流は約 1 0 0 μ A 程度である。ただし、これは後述する R u 2+ を R u 3+ に酸化するのに必要な電流であるので装置としては 5 0 ~ 1 5 0 μ A (可変) で最適な発光量を調節する。この発光をケース 1 上の冷却型 C C D カメラ 1 1 で検出する。検出終了後、ケース 1 内の T P A 溶液はポンプ 1 4 により排出される。検出したデータは A / D コンバータ 1 2 を介してコンピュータ 1 3 に送られる。

図 3 は、本発明の実施の形態におけるハイブリダイゼーション反応を説明する図である。ハイブリダイゼーション反応のとき、電源スイッチ 5 を O N にし電圧を印加することにより、- (マイナス) に帯電するサンプル D N A 1 6 はケース 1 内で、+ (プラス) に帯電する金属支持体 2 に引き寄せられ、金属支持体 2 上のプローブ D N A との反応機会が増え、反応効率が高くなる。これによりハイブリダイゼーション反応の短時間化を可能にする。

反応中はベルチェ 4 によりケース 1 を下部より加熱し、反応温度を一定に保つ。

図 4 は、本発明の実施の形態におけるルテニウム錯体 1 8 を導入したサンプル D N A 1 6 の構造を説明する図である。ハイブリダイゼーション反応溶液のサンプル D N A 1 6 には、電気化学発光物質を修飾させる。

本装置では発光物質にルテニウム錯体 18 を用い、電子供与物質に Tripropylamine (TPA) 17 を用いることで、電気化学発光による検出を可能にする。本実施の形態では架橋剤として N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル (NHS エステル) 19 を用い、NHS エステル 19 にストレプトアビジン 20 を結合させる。一方、サンプル DNA 22 をビオチン 21 によりビオチン化させる。これにより、ストレプトアビジン・ビオチン結合により、サンプル DNA 22 にルテニウム錯体 18 を導入することができる。サンプル DNA 22 のビオチン化については、ピアス社他数社から市販のビオチン化キットを用いて行える。

10 図 5 は、本発明の実施の形態における電気化学発光を説明する図である。このように、あらかじめサンプル DNA 22 に修飾させたルテニウム錯体 18 は、金属支持体 2 に電圧を印加すると TPA 17 と反応し、発光する。

図 6 及び図 7 は、金属支持体 2 上でのルテニウム錯体 18 と TPA 17 の反応を説明する図である。TPA 17 はまず電極板上で電子を 1 個放出した後、陽イオンラジカル (TPA^{+*}) になる。陽イオンラジカルは非常に不安定で、陽子 (H^+) を放出してラジカルになるがこれもまだ不安定なため、 Ru^{3+} と反応して電子を 1 個放出する。一方、 Ru^{2+} は、電極板上で電子を 1 個放出して Ru^{3+} になり、TPA ラジカル (TPA^*) と反応して電子を 1 個もらうが、そのままでは不安定な状態 (励起状態; Ru^{2+*}) にあり、photon (光子) を放出して安定な Ru^{2+} に戻る。

なお、本発明は上記実施の形態に限定されるものではない。

金属支持体としては、白金被膜チタンの他に、白金板、ステンレス板、及び、チタン／白金クラッド等でもよい。チタン／白金クラッドはチタン薄板の上に白金薄板を乗せてボルトで止めたものである。白金被膜チ

タンはチタンの基板に白金をメッキしたものであるもので、メッキの一般的な特徴として表面に分子レベルの凹凸があり、その分、他に例示した白金板、ステンレス板、及び、チタン／白金クラッドよりも電極としての効率がよい。また、金属支持体は金属によって良導電体となっているものであればよく、例えば、ガラスのような絶縁体の基板に金属を被覆したものでもよい。さらに、表面に金属が露出している必要はなく、金属を溶液から守るため金属の表面に薄い誘電体を被覆する等していても、金属支持体から溶液に電荷を供給することができる程度、且つ、ルテニウム錯体及びTPAが反応することができる程度に金属によって良導電体となっているものであればよい。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明によれば、ハイブリダイゼーション反応を短時間で効率的に行うことができる。また、検出に電気化学発光物質を用いることで繰り返し検出が行え、電極から供給する電荷の量・時間を調節することにより、試料に応じた適正な発光量を得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する金属を有することを特徴とするハイブリダイゼーション反応用の支持体。
- 5 2. 生体物質が固定されている請求項 1 記載の支持体。
3. ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する電極を有することを特徴とするハイブリダイゼーション反応用のケース。
4. 請求項 1 又は 2 記載の支持体を収容していることを特徴とする請求項 3 記載のケース。
- 10 5. ハイブリダイゼーション反応用のケースに、反応溶液に電荷を供給する電気を供給することを特徴とするハイブリダイゼーション装置。
6. 生体物質に標識する電気化学発光物質を有することを特徴とする標識試薬。

図 1

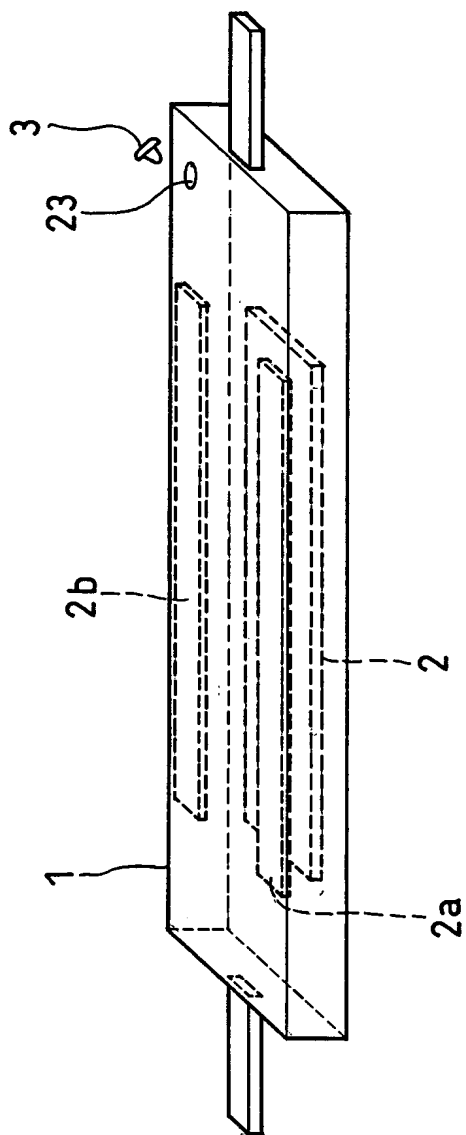


図 2

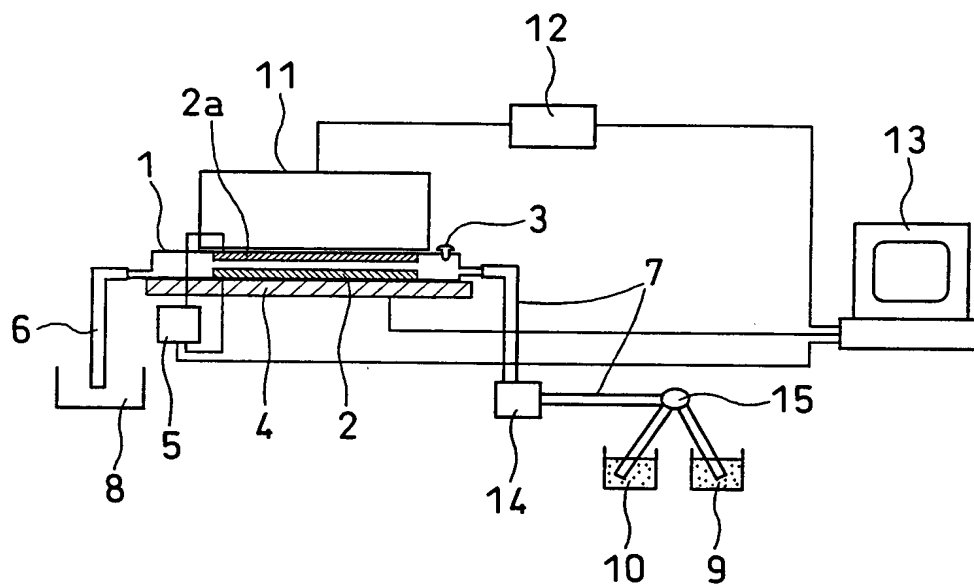


図 5

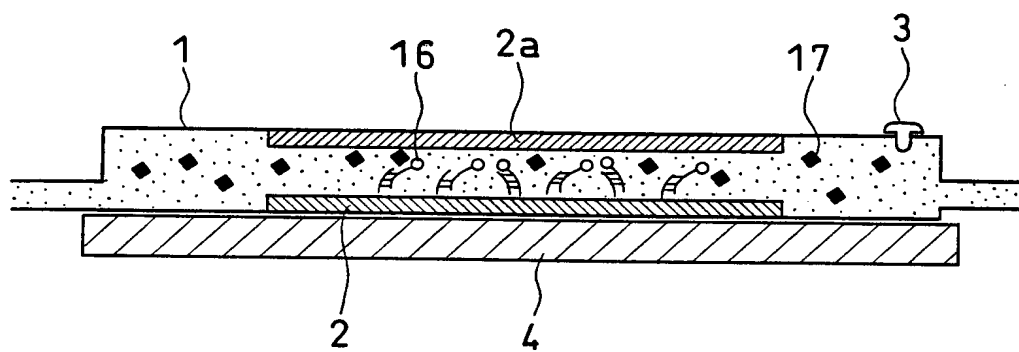
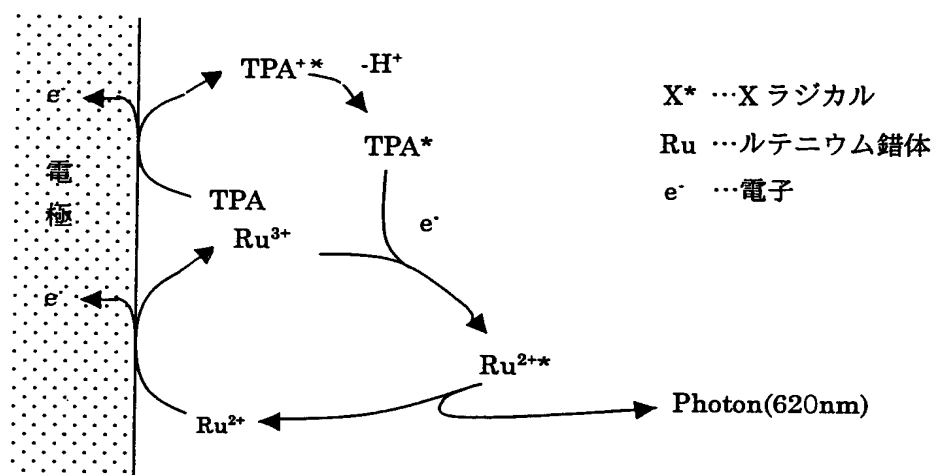
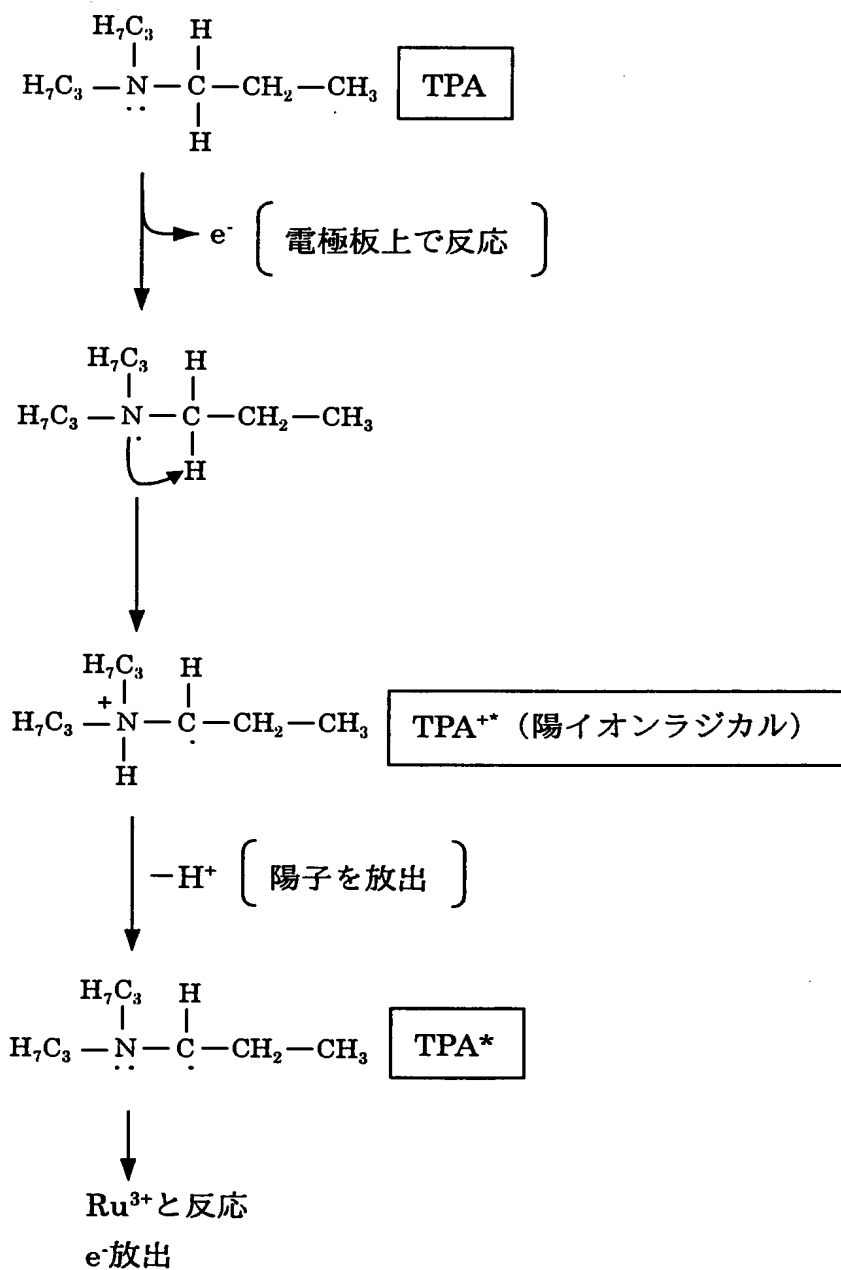


図 6



6/6

図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12M1/00, C12M1/42, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/532, G01N21/76, //C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12M1/00, C12M1/42, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/532, G01N21/76, //C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 10-146183, A (TOSHIBA KK), 02 June, 1998 (02.06.98) (Family: none)	1-6
X	JP, 10-239240, A (HITACHI LTD), 11 September, 1998 (11.09.98) (Family: none)	1-6
X	JP, 8-154656, A (NIKON CORP), 08 June, 1996 (08.06.96) (Family: none)	1-6
Y	WO, 93/10267, A (IGEN INT INC, IGEN INC), 27 May, 1993 (27.05.93) & EP, 567635, A & JP, 6-507316, A & US, 5635347, A & AU, 9331412, A & IL, 103754, A	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 December, 2000 (27.12.00)

Date of mailing of the international search report
16 January, 2001 (16.01.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12M1/00, C12M1/42, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/532, G01N21/76, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12M1/00, C12M1/42, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/532, G01N21/76, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JOIS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-146183, A (TOSHIBA KK) 2. 6月. 1998 (02. 06. 98) ファミリーなし	1 - 6
X	JP, 10-239240, A (HITACHI LTD) 11. 9月. 1998 (11. 09. 98) ファミリーなし	1 - 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27. 12. 00	国際調査報告の発送日 16.01.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇	4N 9839
電話番号 03-3581-1101		内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-154656, A (NIKON CORP) 18. 6月. 1996 (18. 06. 96) ファミリーなし	1 - 6
Y	WO, 93/10267, A (IGEN INT INC, IGEN INC) 27. 5月. 1993 (27. 05. 93) & EP, 567635, A & JP, 6-507316, A & US, 5635347, A & AU, 9331412, A & IL, 103754, A	1 - 6